

Attorney's Docket No. 038779/270668

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE


In re: Tomohiro Kono, et al. Confirmation No.: 3500
Appl. No.: 10/690,049
Filed: October 21, 2003
For: PREPARATION METHOD OF DONOR CELL FOR NUCLEAR TRANSFER
USING ELECTRO-STIMULATION AND MEMBRANE ANTIGEN MARKER
AND PRODUCTION METHOD OF CLONE ANIMAL

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

SUBMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

To complete the requirements of 35 U.S.C. § 119, enclosed is a certified copy of Korean priority Application No. 2002-0064202, filed October 21, 2002.

Respectfully submitted,

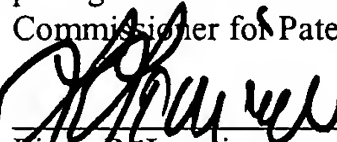


Guy R. Gosnell
Registration No. 34,610

Customer No. 00826
Alston & Bird LLP
Bank of America Plaza
101 South Tryon Street, Suite 4000
Charlotte, NC 28280-4000
Tel Charlotte Office (704) 444-1000
Fax Charlotte Office (704) 444-1111

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to:
Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on March 4, 2004.



Linda R. Louvier



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2002-0064202
Application Number

출원년월일 : 2002년 10월 21일
Date of Application OCT 21, 2002

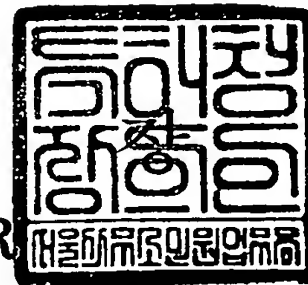
출원인 : 주식회사 마크로젠
Applicant(s) MACROGEN CO., LTD.



2003 년 10 월 15 일

특 허 청

COMMISSIONER





【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002. 10. 21
【발명의 명칭】	전기자극 및 막항원 표시자를 이용한 핵이식용 공여체 준비방법 및 이를 이용한 복제동물의 생산방법
【발명의 영문명칭】	PREPARATION METHOD OF DONOR CELL FOR NUCLEAR TRANSFER USING ELECTROPHORESIS AND MEMBRANE ANTIGEN MARKER AND PRODUCTION METHOD OF CLONE ANIMAL
【출원인】	
【명칭】	주식회사 마크로젠
【출원인코드】	1-1999-015785-2
【대리인】	
【명칭】	유미특허법인
【대리인코드】	9-2001-100003-6
【지정된변리사】	원영호
【포괄위임등록번호】	2001-040185-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	코노 도모히로
【성명의 영문표기】	KONO, TOMOHIRO
【주소】	일본국 도쿄도 기타구 시모 2-16-12
【국적】	JP
【발명자】	
【성명의 국문표기】	권오용
【성명의 영문표기】	KWON, OH YONG
【주민등록번호】	650103-1047222
【우편번호】	121-885
【주소】	서울특별시 마포구 합정동 377-32호
【국적】	KR

**【발명자】****【성명의 국문표기】**

오노 유키코

【성명의 영문표기】

ONO, YUKIKO

【주소】

일본국 카나가와 아시가라카미군 카이세이마치 요시다지마 3598

【국적】

JP

【심사청구】

청구

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
유미특허법인 (인)

【수수료】**【기본출원료】**

18 면 29,000 원

【가산출원료】

0 면 0 원

【우선권주장료】

0 건 0 원

【심사청구료】

13 항 525,000 원

【합계】

554,000 원

【감면사유】

중소기업

【감면후 수수료】

277,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 중소기업기본법시행령 제2조에 의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류_1통



【요약서】

【요약】

본 발명은 전기자극 및 막항원 표시자를 이용한 핵이식용 공여체 준비방법 및 이를 이용한 복제동물의 생산방법에 관한 것이다. 특히 본 발명은 전기자극이 가해진 공여체 및/또는 미분화된 공여체를 사용하여 동물복제 및 유전자 적중 동물의 생산율을 향상시킬 수 있는 방법에 관한 것이다.

【대표도】

도 1

【색인어】

전기자극, 막항원 표시자, 공여체, 핵이식, 동물복제, 유전자 적중 동물

【명세서】**【발명의 명칭】**

전기자극 및 막항원 표시자를 이용한 핵이식용 공여체 준비방법 및 이를 이용한 복제동물의 생산방법{PREPARATION METHOD OF DONOR CELL FOR NUCLEAR TRANSFER USING ELECTROPHORESIS AND MEMBRANE ANTIGEN MARKER AND PRODUCTION METHOD OF CLONE ANIMAL}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 공여체의 막에 존재하는 막항원 표시자를 선별할 수 있는 항체 및 항원-항체 복합체를 나타낸 것이고,

도 2는 자석 비드로 표식된 항체를 공여체에 반응시킨 후 미분화된 공여체만을 선별하는 방법을 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<3> [발명이 속하는 기술분야]

<4> 본 발명은 전기자극 및 막항원 표시자를 이용한 핵이식용 공여체 준비방법 및 이를 이용한 복제동물의 생산방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 공여체에 전기자극을 가하거나, 미분화된 공여체만을 선별하여 핵이식하므로써 유전자 적중 동물 또는 복제동물의 산자율을 향상시킬 수 있는 방법에 관한 것이다.

<5> [종래기술]

- <6> 배아간세포(Embryonic Stem cell)는 수정란이 5일정도 자란 초기 단계인 포배기(Blastocyst)의 세포괴(Inner Cell Mass)에서 분리해낸 세포로서, 모든 세포로 분화될 수 있는 가능성이 있는 전능성(Totipotency)를 가진다. 배아간세포는 인위적으로 생식세포에 넣을 수 있어, 생식세포로도 분화시킬 수 있다. 따라서 이러한 배아간세포의 유용성으로 인하여 일찍부터 배아간세포를 분리하기 위한 연구가 시작되었으며, 이후 배아간세포를 이용한 유전자의 개체 레벨에서의 기능해명을 목적으로 한, 유전자 적중(Knock out)의 생산까지 이루어졌다.
- <7> 유전자 적중 마우스는 특정 유전자만을 제거한 형질전환 마우스로, 상동 재조합으로 특정 유전자를 제거할 수 있는 벡터를 배아간세포에 주입하고, 형질전환된 배아간세포를 선별하여 포배기 수정란에 주입하여 대리모에 착상시킨 다음 출산된 형질전환 마우스간의 교배를 통하여 제조된다.
- <8> 그러나, 유전자 적중 마우스는 생산하기까지 많은 노력과 시간 및 경비가 요구될 뿐만 아니라 유전자 적중 마우스가 불임이 될 확률이 높다.
- <9> 또한 핵이식법을 통하여 유전자 적중 동물을 생산할 수 있다. 핵이식법은 공여핵원 세포를 탈핵한 수여난자에 이식하는 것으로, 크게 세포융합법(Cell fusion)과 세포질내 직접주입법(IntraCytoplasmic Cell Injection; ICCI)을 통하여 실시된다. 세포융합법으로는 화학물질에 의한 노출, 불활화된 센다이 바이러스 주입, 전기자극, 정자직접주입법(IntraCytoplasmic Sperm Injection; ICSI)을 응용한 세포내 핵 주입 방법이 있다. 그러나, 이러한 핵이식법은 낮은 태아의 생산율과 비정상적인 태아의 분만 등 여러 가지 문제점을 가지고 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <10> 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명은 배아간세포와 수여난자간의 핵이식을 통한 클론동물 생산에 있어서, 클론동물의 생산성을 향상시킬 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <11> 또한 본 발명은 클론동물의 생산성을 향상시킬 수 있는 배아간세포 전처리방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <12> 또한 본 발명은 유전자 적중 동물을 안정적으로 생산할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

【발명의 구성 및 작용】

- <13> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 (a) 공여체에 전기자극을 가하는 단계 및 (b) 상기 전기자극 처리된 공여체를 세포주기 분열중기로 동조하는 단계를 포함하는 핵이식용 공여체 준비방법을 제공한다.
- <14> 또한 본 발명은 (a) 공여체에 미분화세포에 특이적으로 발현되는 막항원 표시자에 대한 항체를 반응시키는 단계, (b) 상기 반응시킨 공여체의 항원-항체반응을 확인하여 미분화된 공여체를 선별하는 단계 및 (c) 상기 미분화된 공여체를 세포주기 분열중기로 동조하는 단계를 포함하는 핵이식용 공여체 준비방법을 제공한다.
- <15> 또한 본 발명은 (a) 상기의 핵이식용 공여체 준비방법으로 공여체를 준비하는 단계 및 (b) 준비된 공여체를 염색체가 제거된 수여체로 핵이식시키는 단계를 포함하는 것인 핵이식방법을 제공한다.

- <16> 또한 본 발명은 (a) 상기의 핵이식방법으로 동물 배를 재구성하는 단계 및 (b) 상기 배로부터 동물을 발생시키는 단계를 포함하는 동물의 제조방법을 제공한다.
- <17> 또한 본 발명은 상기의 핵이식용 공여체 준비방법으로 제조된 핵이식용 공여체를 제공한다.
- <18> 또한 본 발명은 상기의 핵이식 방법으로 제조된 재구성된 배를 제공한다.
- <19> 또한 본 발명은 상기의 동물제조방법에 따라 제조된 동물을 제공한다.
- <20> 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- <21> 본 발명자들은 핵이식을 이용한 동물제조방법에 있어서, 핵이식용 공여체에 전기자극을 가하거나 또는/및 미분화된 공여체를 선별하여 동물의 산자율을 향상시킬 수 있는 공여체 준비방법을 개발하였다.
- <22> 공여체는 수여체에 핵을 전달하는 세포를 의미하며, 통상의 체세포 및 생식세포가 이에 해당될 수 있다. 바람직하기로는 배아간세포 또는 간세포이며, 더욱 바람직하게는 세포분열 중기로 동조된 배아간세포 또는 간세포가 좋다. 또한 상기 공여체는 야생형 동물세포일 수 있으며, 야생형 동물세포에 특정 유전자를 삽입하거나, 조작하여 염색체를 유전공학적으로 수정시킨 것일 수 있다. 유전자이식방법이나 유전자 적중법은 통상적인 기술이므로, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시할 수 있다.
- <23> 수여체는 탈핵과정을 통하여 본래의 핵이 제거되고, 공여체로부터 핵을 전달받는 세포를 의미한다. 통상의 모든 세포는 수여체일 수 있으나, 본 발명에서는 핵이식으로 배를 재구성하여 이후 동물을 발생시킬 수 있는 잠재력을 가진 세포가 수여체로 바람직하며, 대표적인 예로는 난자가 있다. 더욱 바람직하게는 감수분열II 중기의 난자이다.

- <24> 상기 공여체 및 수여체는 동물세포가 바람직하며, 구체적인 예로는 마우스, 랫, 양, 염소, 돼지, 소, 원숭이, 사람을 포함하는 모든 포유류 유래 세포일 수 있다. 공여체 및 수여체는 통상적인 핵이식방법에서 사용되는 방법에 따라 배양 또는 전처리될 수 있다.
- <25> 본 발명의 공여체 준비방법은 공여체에 전기자극을 가하는 단계 및 상기 전기자극 처리된 공여체를 세포주기 분열중기로 동조하는 단계를 포함한다. 또한 핵이식용 공여체 준비방법은 전기자극 처리된 공여체에 미분화세포에 특이적인 막항원 표시자에 대한 항체를 반응시켜 미분화된 공여체를 선별하는 단계를 더욱 포함할 수 있으며, 선별된 미분화 공여체는 이후 감수분열 중기로 동조할 수 있다.
- <26> 본 발명의 전기자극은 전압 200 내지 350 V, 콘덴서치 900 내지 1000 uF, 저항치 무한대에서 10 내지 30 msec간 실시할 수 있으며, 바람직하게는 전압 266 내지 300 V, 콘덴서치 975 uF, 저항치 무한대, 17.8 내지 21.6 msec간 실시하는 것이다. 상기 전압, 콘덴서치 및 전기자극 시간의 범위를 벗어날 경우, 이후 핵이식에 의한 동물생산율이 낮아질 수 있다.
- <27> 또 다른 핵이식용 공여체 준비방법은 (a) 공여체에 미분화세포에 특이적으로 발현되는 막항원 표시자에 대한 항체를 반응시키는 단계, (b) 상기 반응시킨 공여체의 항원-항체반응을 확인하여 미분화된 공여체를 선별하는 단계 및 (c) 상기 미분화된 공여체를 세포주기 분열중기로 동조하는 단계를 포함한다. 본 발명의 핵이식용 공여체 준비방법은 (a) 단계 이전에 공여체에 전기자극 가하는 단계를 더욱 포함할 수 있다.
- <28> 상기 막항원 표시자는 미분화세포에서 특이적으로 발현되어 세포막에 위치하는 모든 종류의 단백질이며, 바람직하게는 SSEA-1(stage-specific embryonic antigen-1), CD117(c-kit), sca-1(Stem Cell Antigen), 및 CD31(PECAM-1, Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질이다. 특히 SSEA-1은 8세포기에서 발현되기

시작되어 미분화 상태인 상실배(morila) 및 세포괴(inner cell mass)까지 발현되며 세포가 분화되면서 발현이 소실된다.(Develop. Growth Differ. 1999. 41:293)

- <29> 미분화된 공여체 선별단계에서는 항체와 공여체 세포막에 위치한 막항원 표시자간의 항원-항체 복합체를 형성여부를 확인하여 미분화된 공여체를 분리하는 것으로, 통상적인 면역분석법으로 확인할 수 있다. 항체는 막항원 표시자에 대한 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체이다.
- <30> 본 발명에서는 일예로 자석을 이용한 항원-항체 복합체 분석방법을 이용하였다.(도 1 및 2) 자석을 이용한 방법은 초미세 자석비드(micro magnetic bead)가 표식된 항체를 공여체에 반응시키고, 자석을 통하여 항원-항체 복합체가 형성된 공여체만을 분리하는 하거나, 일차항체 사용후 초미세 자석비드로 표식된 이차항체를 이용하여 항원-항체 복합체가 형성된 공여체만을 분리하는 방법이다.
- <31> 더욱 상세하게는 도 1에 도시한 바와 같다. 즉 막항원 표시자 항체에 바이오틴이 접합된 형태로 제조하고, 이를 막항원 표시자에 반응시킨 다음 자석비드가 결합된 항-바이오틴 항체를 이차로 결합시킬 수 있다.(도 1a). 또한 막항원 표시자 항체를 막항원 표시자에 반응시킨 다음 자석비드가 결합된 항-IgM 항체를 이차로 결합시킬 수 있다.(도 1b) 상기한 방법으로 형성된 항원-항체 복합체는 복합체내에 포함된 자석비드를 이용하여 막항원 표시자를 발현하는 미분화된 공여체를 선별할 수 있다.
- <32> 본 발명의 공여체 준비방법으로 제조된 공여체는 세포융합 또는 세포질내 직접주입법에 의하여 수여체에 핵을 이식시킬 수 있으며, 바람직하게는 세포융합이다.

- <33> 또한 본 발명은 (a) 본 발명의 공여체 준비방법으로 공여체를 준비하는 단계, (b) 공여체를 염색체가 제거된 수여체로 핵이식시키는 단계를 포함하는 핵이식방법 및 상기 방법으로 제조된 재구성된 배를 제공한다.
- <34> 상기 (b) 단계는 공지된 기술로 실시할 수 있으며, 본 발명에서는 구체적인 예로 노코다졸 처리에 의한 방법을 사용하였다.
- <35> 상기 (c) 단계는 화학물질, 센다이 바이러스 또는 전기자극을 이용한 세포융합이나 세포질내 직접주입법에 의하여 실시할 수 있다. 상기한 기술들은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 누구나 실시가능하다.
- <36> 또한 본 발명은 상기의 핵이식방법으로 동물 배를 재구성하는 단계 및 상기 배로부터 동물을 발생시키는 단계를 포함하는 동물의 제조방법을 제공한다. 상기 동물을 발생시키는 단계는 재구성된 배를 가임신된 동물의 자궁에 착상시키고, 이를 출산시키므로써 실시될 수 있다.
- <37> 본 발명의 핵이식용 공여체 준비방법은 동물복제나 유전자 적중 동물을 제조함에 있어서, 산자율을 향상시켜 효율적으로 동물복제를 실시할 수 있다.
- <38> 이하 본 발명의 실시예를 기재한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <39> 실시예 : 전기자극 처리된 공여체를 이용한 핵이식
- <40> 1-1. 배아간세포의 배양과 전기자극 처리
- <41> 동결 보존하였던 배아간세포(6×10^5 cells)를 해동하여, 마우스 태아섬유아세포로부터 얻은 공급(Feeder)세포가 있는 직경 60 mm 디쉬 3장에 파종하였다. 배양액은 15 %(v/v) FBS(Fetal Bovine serum, Gibco), 103 u/ml 백혈병 저해인자(leukemia inhibitory factor, Wako Pure

Chemical Industries, Osaka), 2 mM L-글루타민(Gibco), 1%(v/v) 비필수 아미노산 용액 (non-essential amino acid solution, Gibco) 및 5.5×10^{-5} M 2-머캅토에탄올(Wako)을 포함하는 넥아웃-DMEM(Knockout-DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY)를 사용하였다.

<42> 배아간세포는 하루에 한번씩 배양액을 교환하면서, 5% CO₂, 5% O₂ 및 90% N₂의 조건하의 배양기내에서 2일간 배양하였다. 배아간세포가 컨플루언트 상태가 되면 0.05-0.53 M 트립신 EDTA 용액으로 5분간 처리하여 세포를 디쉬로부터 탈착시켜 0.4 ml HBS 완충액으로 희석하여 전기자극을 가하였다.

<43> 전기자극의 조건은 전압 266 V, 콘덴서치 975 uF, 저항치 무한대에서 20 msec간 실시하였다. 배아간세포는 전기자극 직후에 얼음위에서 10분간 정치한 다음, 직경 60 mm 디쉬의 공급세포 위에 파종하여 배양하였다.

<44> 1-2. 배아간세포의 분열중기(Meta-phase stage)에의 세포주기 동조

<45> 배아간세포는 전기자극 처리 후에 공급세포와 함께 배양하였고, 배양 3일째에 노코다졸 (Nocodazole, 0.4 ug/ml)을 첨가한 배양액에서 2-4시간 배양하였다. 분열중기의 세포는 접착성을 잃어버리고 배양액중으로 떠오르기 때문에 배양액의 윗부분만 회수하여, 원심분리기로 1,000rpm으로 5분간 원심하면 분열중기의 배아간세포주기를 거의 단일세포로 수득할 수 있었다.

<46> 1-3. 핵이식과 체외배양

<47> 암컷 B6CBF1(C57BL/6 x CBA)마우스에 PMSG(Pregnant mare serum gonadotropin)와 hCG(Human Chorionic Gonadotropin)를 48시간간격으로 투여하고, hCG투여 14시간 후에 난관팽대부로부터 미수정란을 회수하였다. 미세조작기로 미수정란의 세포질 중 약간 튀어나온 부분 또는 세포

질보다 투명한(염색체가 존재하는 부분이 이런 형태로 관찰됨) 부분과 가장 가까운 부분의 투명대를 1/5정도 절개하였다. 이후 사이토칼라신 B(5 ug/ml)을 포함하는 M2액상에서, 절개된 투명대의 틈으로 미세조작용 유리관을 넣고, 약간의 세포질과 함께 염색체를 흡인하여 제거하였다. 염색체가 제거된 미수정란은 분열중기의 배아간세포와 함께 센다이 바이러스(HVJ)로 융합시켰다.(Kono, T., Kwon, OY., & Nakahara, T. (1991) Journal of Reproduction Fertility 및 Kono, T., Sotomaru, Y., Aono, F., Takahashi, T., Ogiwara, I., Sekizawa, F., Arai, T., & Nakahara, T. (1994) Theriogenology 41, 1463-1471) 핵이식 조작은 사이토칼라신 B(cytochalasin B, 5 ug/ml, Sigma)와 노코다졸(0.4 ug/ml)이 첨가된 M2 배양액에서 실시하였다.

<48> 융합된 세포는 CZB 배양액중에서 2시간동안 배양하였고, 10 mM 스트론튬(Strontium)용액에서 6시간 배양하였다. 1극체 및 1전핵을 갖고있는 난자를 CZB배양액으로 옮기고, 5% CO₂, 5% O₂ 및 90% N₂의 조건의 배양기내에서 4일간 배양하였다. 포배기의 난자는 정관수술한 숫컷과 교배시켜 2.5일째 되는 대리모의 자궁에 이식하여, 임신 19.5일째에 제왕절개하여 태자의 유무를 확인하였다.

<49> 실시예 2: 막항원 표시자를 이용한 미분화세포 선별후 핵이식

<50> 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 실시하였으며, 전기자극은 실시하지 않았으며, 실시예 1의 1-3 단계이전에 하기 실험을 더욱 실시하였다.

<51> 막항원 표시자를 이용한 미분화세포 선별



- <52> 배아간세포는 자석 컬럼(Magnetic column, Milteniyi Biotec)에 의해 막표면 항원에 대하여 양성(+)인 세포와 음성(-)인 세포를 분리하기 위하여, 마이크로 비드(Micro Beads)에 의한 자석표식을 실시하였다.
- <53> 분열중기의 배아간세포를 농도 7 ug/100ul의 항체(항 마우스 SSEA-1)에 1시간 동안 37 °C에서 반응시켰다. 죽은 세포를 제거하고, (Dead Cell Removal Kit: Milteniyi Biotec #130-090-101), 마이크로 비드로 표식된 2차 항체(Rat anti-Mouse IgM Micro Beads: Milteniyi Biotec #130-047-302)를 넣어 6 내지 12 °C에서 15분간 반응시켰다. 이후, 반응시킨 배아간세포는 마그네틱 필드에 설치한 분리 컬럼넣고 항원-항체반응이 형성된 배아간세포만을 분리하였다.(도 1)
- <54> 실시예 3: 전기자극 및 막항원 표시자를 이용한 미분화세포 선별후 핵이식
- <55> 실시예 1과 동일하게 실시하였으며, 실시예 1의 1-3 단계 이전에 실시예 2에 기재된 막항원 표시자를 이용한 미분화세포 선별실험을 실시하여 미분화세포를 공여체로 이용하여 핵이식하고, 대리모의 자궁에 착상시킨 후 산자율을 확인하였다.
- <56> 비교예 1
- <57> 실시예 1과 동일한 방법으로 실시하였고, 배아간세포의 전기자극은 실시하지 않았다.
- <58> 비교예 2
- <59> 실시예 3과 동일한 방법으로 핵이식을 실시하였고, 다만 핵이식에 사용한 공여체는 막항원을 이용한 미분화된 세포 선별법에서 음성으로 판단된 분화된 배아간세포를 사용하였다.
- <60> 실험예
- <61> (1) 배아간세포의 전기자극 처리에 따른 산자율 검증



<62> 실시예 1과 비교예 1의 방법으로 핵이식을 실시하여 확인한 난자의 착상수, 임신율 및 산자수를 각각 측정하여 하기 표 1에 나타내었다.

<63> 【표 1】

	핵이식 후 배양수	포배기(%)	임신수/대리모수(%)	착상수(%)	산자수(%)
비교예	320	148(46.3)	5/12	24(16.2)	0
실시예	245	110(44.9)	6/9	57(51.9)	3(2.7)

<64> 표 1에서, 배아간세포에 전기자극을 실시한 실시예 1의 경우가 비교예에 비하여 착상수 및 산자수가 높게 나타났다.

<65> (2) 배아간세포의 분화에 따른 산자율 검증

<66> 공여체로 사용되는 배아간세포의 분화여부에 따른 산자율을 검증하고자, 실시예 3 및 비교예 2의 방법에 따른 재구축란의 착상수, 임신율 및 산자수를 각각 측정하여 하기 표 2에 나타내었다.

<67> 【표 2】

	핵이식 후 배양수	포배기(%)	착상수(%)	산자수(%)
비교예 2	55	37(67)	13(24)	0
실시예 3	70	51(73)	39(56)	3(5.9)

<68> 표 2에서, 공여체로 미분화된 배아간세포를 사용한 실시예 3의 방법이 높은 포배기에의 발생율, 착상율 및 산자율을 나타내었으며, 반면에 분화된 배아간세포를 이용한 비교예 2의 경우 실시예 3에 비하여 성공률이 낮게 나타났다.



【발명의 효과】

<69> 본 발명의 핵이식용 공여체 준비방법은 핵이식법에 의한 동물 산자율을 향상시킬 수 있는 공여체를 쉽고, 간편하게 제조할 수 있도록 하여 복제동물 또는 유전자 적중 동물을 효율적으로 생산할 수 있도록 한다.



【특허청구범위】

【청구항 1】

- (a) 공여체에 전기자극을 가하는 단계; 및
- (b) 상기 전기자극 처리된 공여체를 세포주기 분열중기로 동조하는 단계를 포함하는 핵이식용 공여체 준비방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 전기자극은 200 내지 350 V의 전압, 900 내지 1000 μ F의 콘덴서치 및 저항치 무한대에서 10 내지 30 msec간 실시되는 것인 핵이식용 공여체 준비방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 핵이식용 공여체 준비방법은

상기 (a) 단계의 전기자극 처리된 공여체에 미분화세포에 특이적인 막항원 표시자에 대한 항체를 반응시켜 미분화된 공여체를 선별하는 단계를 (b) 단계 이전에 더욱 포함하는 것인 핵이식용 공여체 준비방법.

【청구항 4】

- (a) 공여체에 미분화세포에 특이적으로 발현되는 막항원 표시자에 대한 항체를 반응시키는 단계;
- (b) 상기 반응시킨 공여체의 항원-항체반응을 확인하여 미분화된 공여체를 선별하는 단계; 및

(c) 상기 미분화된 공여체를 세포주기 분열중기로 동조하는 단계를 포함하는 핵이식용 공여체 준비방법.

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 상기 미분화 세포에 특이적으로 발현되는 막항원 표시자는 SSEA-1(stage-specific embryonic antigen-1), CD117(c-kit), sca-1(Stem Cell Antigen) 및 CD31(PECAM-1, Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 핵이식용 공여체 준비방법.

【청구항 6】

제 1항 내지 5항 중 어느 한항에 있어서, 상기 공여체는 배아간세포인 것인 핵이식용 공여체 준비방법.

【청구항 7】

제 1항 내지 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 공여체의 염색체가 유전공학적으로 더욱 수정된 것인 핵이식용 공여체 준비방법.

【청구항 8】

제 1항 내지 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵이식은 세포융합인 것인 핵이식용 공여체 준비방법.

【청구항 9】

(a) 제 1항 내지 제 5항중 어느 한 항에 따른 방법으로 공여체를 준비하는 단계;

(b) 준비된 공여체를 염색체가 제거된 수여체로 핵이식시키는 단계;
를 포함하는 것인 핵이식방법.

【청구항 10】

(a) 제 9항의 방법으로 핵이식방법으로 동물 배를 재구성하는 단계; 및
(b) 상기 재구성된 배로부터 동물을 발생시키는 단계
를 포함하는 동물의 제조방법.

【청구항 11】

제 1항 내지 5항중 어느 한 항에 따른 방법으로 제조된 핵이식용 공여체.

【청구항 12】

제 9항의 핵이식방법으로 제조된 재구성된 배.

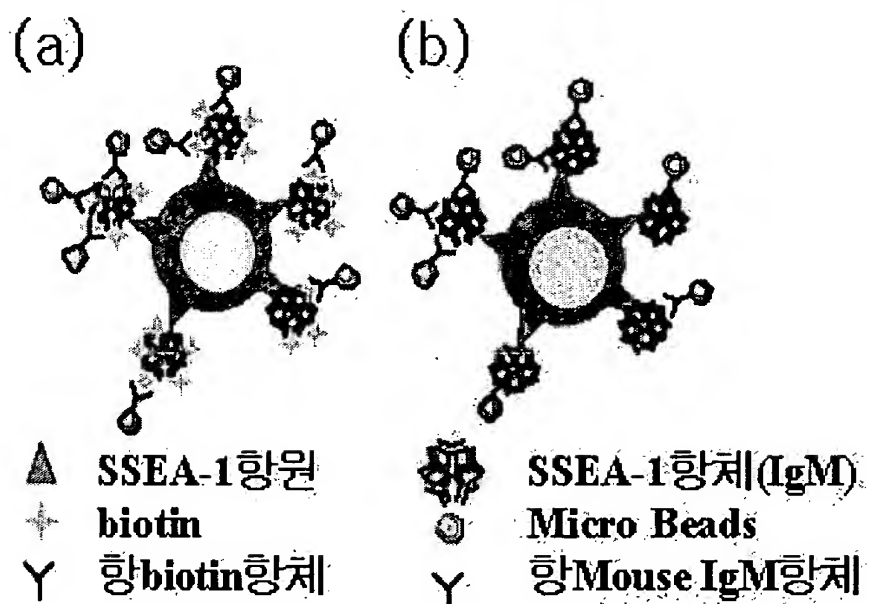
【청구항 13】

제 10항에 따른 방법으로 제조된 동물.



【도면】

【도 1】



【도 2】

